动 物 学 研 究 2006，Jun. 27（3）：325－330 CN 53－1040/Q ISSN 0254－5853
Zoological Research

恒河猴大脑前额叶 cDNA 文库的构建

李 易[1,2,4,5]，黄 薇[3]，张 新[3]，宿 兵[1,2,*]

（1. 中国科学院昆明动物研究所 细胞与分子进化重点实验室，云南 昆明 650223；
2. 中国科学院昆明灵长类研究中心，云南 昆明 650223；3. 国家人类基因组南方研究中心，上海 201203；
4. 曲靖师范学院 化学与生命科学系，云南 曲靖 655065；5. 中国科学院研究生院，北京 100039）

摘要： 为筛选出与认知、记忆相关的脑部表达基因及基因家族，利用 TRIzol 试剂从恒河猴大脑前额叶组织抽提总 RNA，再用纯化试剂盒从总 RNA 中成功纯化出 mRNA。按照 Stratagene 公司的 cDNA Synthesis Kit（200401）、ZAP-cDNA Synthesis Kit（200400）和 ZAP-cDNA GigapackⅢ Gold Cloning Kit（200450）三个试剂盒的操作说明，构建了恒河猴大脑前额叶组织的 cDNA 文库。文库总库容为 2.0×10^6 克隆；绝大多数的 cDNA 插入片段≥0.5 kb，平均长度≈1.0 kb；cDNA 片段与噬菌体载体重组率为 97.3%。文库各项指标均达要求，为克隆大脑 PFC 区表达基因、测定基因编码区序列、揭示具有多种剪切组合模式等提供了可靠资源，也为相关基因表达调控的研究提供了方便。

关键词： 恒河猴；大脑前额叶；cDNA 文库；大脑表达基因
中图分类号： Q959.948；Q343.1；Q78 **文献标识码：** A **文章编号：** 0254－5853（2006）03－0325－06

Construction of a cDNA Library of the Prefrontal Cortex of Rhesus Monkey

LI Yi[1,2,4,5], HUANG Wei[3], ZHANG Xin[3], SU Bing[1,2,*]

(1. Key Laboratory of Cellular and Molecular Evolution, Kunming Institute of Zoology, the Chinese Academy of Sciences, Kunming 650223, *China; 2. Kunming Primate Research Center, the Chinese Academy of Sciences, Kunming* 650223, *China;*
3. The Research Center of Chinese National Human Genome at Shanghai, Shanghai 201203, *China;*
4. Department of Chemistry and Life Science, Qujing Normal College, Qujing 655065, *China;*
5. Graduate University of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, *China)*

Abstract: Total RNA was extracted from the prefrontal cortex (PFC) of rhesus monkeys with TRIzol reagent. mRNA was further purified from total RNA using a purifying kit for mRNA. According to the manual of cDNA Synthesis Kit (200401), ZAP-cDNA Synthesis Kit (200400), and ZAP-cDNA GigapackⅢ Gold Cloning Kit (200450) from Stratagene, we constructed a cDNA-library of the PFC of rhesus monkeys. Our aim was to identify brain-function (such as cognition and memory) related genes and gene families. The cDNA library has a capacity of 2.0×10^6 clones, and 97.3% of them are recombinant clones. The average size of the inserted cDNA fragments is 1.0 kb with the majority of inserts larger than 0.5 kb, which meets the requirement of a standard cDNA library. The PFC cDNA library constructed will be useful in cloning and sequencing brain-function related genes, and in dissecting the alternative splicing patterns of genes expressed in the brain. Meanwhile, it will also serve as a useful resource in understanding the expression regulations within the brain.

Key words: Rhesus monkey; Prefrontal cortex in rhesus brain; cDNA-library; Genes expressed in brain

在灵长类动物的进化历程中，以学习和记忆为 主的认知能力的提高及大脑容量的增加是其最为突

* 收稿日期：2006－01－12；接受日期：2006－03－24
基金项目：国家科技部973项目，2006CB701506；国家自然科学基金委项目（30370755，30440018）；中国科学院重要方向项目（KSCX2-SW-121）
* 通讯作者（Corresponding author），E-mail：sub@mail.kiz.ac.cn

出的特征之一。现代人的大脑容量是旧大陆猴（如猕猴 *Macaca mulatta*）脑容量的 20.6 倍，长臂猿的 14.4 倍。与人类亲缘关系最近的灵长类——黑猩猩（*Pan troglodytes*）相比，人的大脑容量也是其容量的 4.3 倍，其中尤以与高级认知功能关系最为密切的前额叶区（prefrontal cortex，PFC）的扩张最为显著（Shou，2001）。有限的基因组 DNA 序列的比较研究表明，人类与灵长类的 DNA 序列极为相似，如人类和恒河猴的基因编码区的序列相似度达 95%（Wang et al，2003；Osada et al，2002；Kawamura et al，1991；Savatier et al，1987），而同黑猩猩的相似度高达 98.8%（Ebersberger et al，2002；Fujiyama et al，2002；Chen & Li，2001；Goodman et al，1998）。因此，DNA 序列上的相似性难以解释在认知能力和其他表型上人类与非人灵长类的差异。就灵长类的大脑发育过程而言，在人类进化过程中产生新基因的可能性较小，很可能是参与神经细胞增殖、分化和迁移的精细调控的一系列基因的变异（如基因表达调控区和基因编码区的序列变异）导致灵长类种间，特别是人类与非人灵长类之间在大脑容量和神经网络的精细结构上产生了差异。

通过研究非人灵长类关键脑区（如前额叶区）基因表达的模式和图谱，人们将能够找到在大脑组织中特异表达的基因和基因家族。这些基因和基因家族无疑同相关的认知功能存在密切联系，并将为了解神经传导的网络结构和信号传导的生化路径提供丰富的信息。前额叶皮层位于大脑最前端，具有显著发达的颗粒第Ⅳ层，以及广泛而复杂的传入和传出神经联系，是惟一接受丘脑背内侧核直接投射的新皮层，也是惟一向下丘脑有直接投射的新皮层。前额叶皮层与纹状前视区、颞叶联合皮层、顶叶联合皮层有纤维联系；与基底前脑、扣带回和海马回有直接或间接联系。复杂的纤维联系决定了前额叶皮层具有复杂的功能。哺乳动物进化程度越高，前额叶皮层的面积也越大。灵长类具有发达的前额叶皮层，人类的前额叶皮层占整个大脑面积的约 29%（Shou，2001）。

基于上述背景，我们构建了猕猴大脑前额叶组织的 cDNA 文库，其主要目的是通过 cDNA 文库，克隆并测定代表灵长类物种大脑特异性表达基因的一级序列，从文库中筛选出与认知、记忆相关的组织特异性表达基因及基因家族，为揭示高级认知功能的起源和遗传基础提供线索。

1 材料和方法

1.1 材 料

猕猴脑 PFC 组织 1.2 g，来自 4 岁雄性猕猴。cDNA Synthesis Kit（200401）、ZAP-cDNA Synthesis Kit（200400）及 ZAP-cDNA Gigapack Ⅲ Gold Cloning Kit（200450）三个试剂盒和 TRIzol 试剂来自 Stratagen 公司。mRNA 纯化试剂盒购于 QIAGEN 公司。T_3、T_7 引物及其他试剂由上海生工公司和大连宝生物公司提供。

1.2 方 法

1.2.1 总 RNA 提取 将猕猴用氯氨酮麻醉后，手术取出脑 PFC 组织 1.2 g，立即投入液氮冷冻。随后把 PFC 组织转入研钵，在液氮中磨碎成粉末。液氮完全挥发后，将粉末状样品转入盛有 12 mL TRIzol 且用 DEPC 水处理过的 15 mL 离心管中。按照说明书进行酚、氯仿抽提和冷乙醇沉淀。75%冷乙醇漂洗，干燥后将 RNA 溶入 50 μL DEPC 处理过的水，室温溶解 2 h。取出溶解的 RNA 溶液 1 μL，稀释 100 倍测 RNA 浓度和纯度。DEPC 水处理的 1%甲醛变性琼脂糖凝胶电泳，检测 RNA 质量。

1.2.2 mRNA 的分离纯化 按照 mRNA 纯化试剂盒说明书的要求，从总 RNA 中分离纯化 mRNA。检测 mRNA 浓度和纯度，DEPC 水处理的 1%甲醛变性琼脂糖凝胶电泳检测 mRNA 质量。

1.2.3 cDNA 合成及连接 按照试剂盒说明书，于 1.5 μL 试管中加入 10 × 第一链合成缓冲液 5 μL、甲基化 dNTP 混合液 3 μL、Oligo（dT）$_{12-18}$ 引物（1.4 μg/μL）2 μL、DEPC 处理水 17.5 μL、RNA 酶抑制酶（40 U/μL）1 μL，混匀，随后加入预变性的 mRNA（0.1 μg/μL）20 μL。把试管置于室温（23 ℃）10 min，加 1.5 μL StrataScript™ 反转录酶（50 U/μL）到反应体系中。42 ℃温度育 1 h 后，将试管转置于冰上。加入 10 × 第二链合成缓冲液 20 μL、合成的第二链 dNTP 混合物 8 μL、无菌水 109 μL。混匀，加入 RNase H（1.5 U/μL）2 μL 和 DNA 聚合酶Ⅰ（9.0 U/μL）11 μL，置于 16 ℃冷浴 2.5 h。加入平头反应 dNTP 混合物 23 μL 和克隆 *Pfu* DNA 聚合酶（2.5 U/μL）2 μL，置于 72 ℃热温 30 min 形成平头末端。用 T4DNA 连接酶连接 *Eco*RⅠ连接头，磷酸化 *Eco*RⅠ连接头末端，再用 *Xho*Ⅰ酶消化。获得的 cDNA 片段用凝胶层析柱分级，抛弃小于 0.5 kb 的片段，剩余片段连接到 Uni-ZAP

XP 载体上。

1.2.4　噬菌体包装和测定噬菌体滴度　将连接到 Uni-ZAP XP 载体上的 cDNA 片段（约 2.5 μL × 2 = 100 ng × 2）立即分别加入两个融化的装有包装试剂的试管中。置试管于室温（22 ℃）下 100 min。加入 500 μL SM 缓冲液，再加入 20 μL 氯仿，混均后 12 000 × g 离心 10 min。把上清液（包含噬菌体，）轻轻转入两个新试管（cDNA 文库，各约 500 μL），存放于4 ℃冰箱。用SM缓冲液，按照1∶10、1∶100、1∶1000 的浓度稀释 λ – 噬菌体。再用 10 mmol/L $MgSO_4$ 溶液将宿主菌（XL1-blue）稀释到 OD_{600} = 0.5，以每 200 μL 为一份的方式，各取 3 份分别加入到 3 个新试管中，3 个试管编号为 1、2、3 号。把 3 种不同稀释浓度的 λ – 噬菌体各 1 μL，按照从高浓度到低浓度的顺序分别加入到 1、2、3 号三个新试管中。将 3 个试管混合均匀，置于 37 ℃ 15 min。将 3 mL 熔化的 LB 琼脂培养基冷却到 50 ℃，然后迅速加入 0.5 mol/L IPTG 15 μL 和 X-gal（250 mg/μL）50 μL，再将 λ – 噬菌体和宿主菌（XL1-blue）的混合液加入，混合均匀后倒入 3 个对应编号的 LB 培养基固体平板上，均匀铺开并凝固 10 min。翻转平板，置于 37 ℃温箱过夜培养。记数三个平板上的噬菌斑。

1.2.5　λ – 噬菌体的切开和环化　分别挑取 XL1-blue MRF’ 和 SOLR 菌株的单菌落克隆，接种到加有 10 mmol/L $MgSO_4$ 和 0.2%（W/V）麦芽糖的 5 mL LB 液体培养基中。37 ℃，200 r/min，摇床培养过夜。各取 100 μL 上述培养液，分别转接 4 mL 与上同样的培养基中，30 ℃，200 r/min，摇床培养 8 h。XL1-blue MRF’ 和 SOLR 菌株的 OD_{600}值分别达到 2.66 和 3.10。1 000 × g 离心 10 min，弃上清液。用 10 mmol/L $MgSO_4$ 的溶液重新悬浮 XL1-blue MRF’ 和 SOLR 菌株，使它们的 OD_{600}值分别为：OD_{600}（XL1-blue MRF’）= 1.08；OD_{600}（SOLR）= 0.989。在一个 1.5 mL 的离心管中加入 200 μL 上述含有 XL1-blue MRF’ 的 10 mmol/L $MgSO_4$ 溶液、20 μL cDNA 库中的噬菌体溶液和 1 μL VCS-M13 辅助噬菌体，混合均匀，37 ℃培养 23 min；转入 50 mL 新离心管，加入 2 mL LB 液体培养基，随后 37 ℃、200 r/min 摇床培养 1 h。70 ℃加热 20 min。吸出 1 mL LB 液体培养基到 1.5 mL 离心管中，1 000 × g 离心 10 min，将上清液转入新的 1.5 mL 离心管中。吸出 1 μL 上清液，加入到新的 1.5 mL 离心管中。同时，将前面的 SOLR 菌株的 10 mmol/L $MgSO_4$ 溶液（OD_{600} = 1.08）取出 200 μL，加入到离心管中，混合均匀并置于 37 ℃温育 15 min。将试管从 37 ℃转移至室温（22 ℃），分别加入 IPTG 10 μL，X-gal 100 μL。混合均匀，置于 37 ℃ 15 min，把试管中的全部混合液涂在含有氨苄青霉素（50 μg/mL）的 LB 琼脂平板上。37 ℃培养过夜，记数大肠杆菌菌落。

1.2.6　文库质量鉴定　将上一步中 37 ℃培养过夜的 LB 琼脂平板取出，置于 4 ℃冰箱 10 h，使非重组菌落充分显示蓝色，计数白色菌落和蓝色菌落。cDNA 片段插入 λ-ZAP 载体的大肠杆菌克隆表现为白色菌落，载体中没有插入 cDNA 片段的大肠杆菌克隆表现为蓝色菌落。白色菌落占总菌落数的比例就是 cDNA 片段与噬菌体的重组率。用宝生物的普通 Taq 酶试剂盒，随机选取 960 个白色菌落作模板，扩增插入的 cDNA 片段。扩增程序如下：每个 200 μL 试管中加入 71 μL 去离子水，用灭菌牙签轻蘸白色菌落后再转入去离子水中蘸一下。将试管置于 95 ℃使细菌裂解，10 min 后立即转置于冰浴中冷却。按试剂盒说明，分别加入 10 × PCR 缓冲液、dNTP、引物和 Taq 酶，终体积为 100 μL。扩增条件：94 ℃，5 min；94 ℃，30 s，55 ℃，30 s，72 ℃，2 min，35 个循环；最后 72 ℃，延伸 7 min。取 5 μL 反应液在 1.5% 浓度的 TBE 琼脂糖凝胶上，5 V/cm 电泳 40 min。紫外成像，对照电泳标记大小记录结果并保存电泳图。

2　结　果

2.1　总 RNA 提取和 mRNA 的分离纯化

高质量的总 RNA 和 mRNA 是构建高质量 cDNA 文库的基本条件。我们用液氮冷冻研磨猕猴脑 PFC 组织，用 Invitregen 公司的 TRIzol 试剂提取总 RNA。检测 RNA，其 $OD_{260/280}$ = 1.91。电泳结果显示：28*S*、18*S* 和 5*S* 三条带比较清晰，RNA 几乎没有降解。28*S* 带的亮度约是 18*S* 带的两倍（图 1A）。使用 QIAGEN 公司的 mRNA 纯化试剂盒，得到了高质量的 mRNA。电泳结果表明：mRNA 产物呈现连续的带状分布，看不到 28*S*、18*S* 和 5*S* 三条带，产物是纯的 mRNA 分子（图 1B）。

2.2　cDNA 文库描述

2.2.1　文库滴度和库容　文库的λ噬菌体溶液总体积是2 × 500 μL。噬菌体滴度测定结果见表1。噬

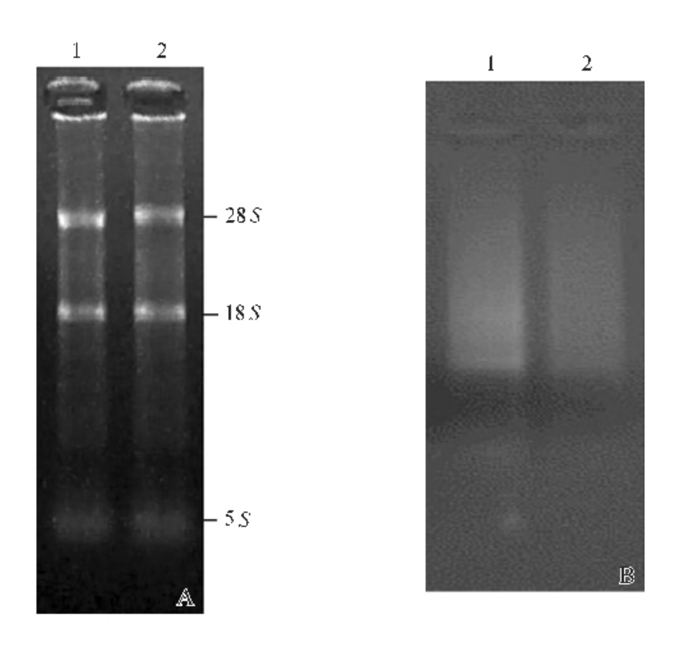


图 1 猕猴大脑前额页区提取的总 RNA（A）和 mRNA（B）电泳图
Fig. 1 The electromorph of total RNA（A）and mRNA（B）extracted from prefronal cortex of the rhesus monkey
电泳图点样孔上方的数字表示同一样品点了两个样孔。
The numbers indicate the two lanes loaded with the same samples.

菌体滴度平均数 $\approx 2.0\times10^6$（pfu/mL），文库的总库容为 2×0.5 mL $\times 2.0\times10^6$/mL $= 2.0\times10^6$（克隆）。

2.2.2 cDNA 插入片段长度 通过 PCR，用 T_3、T_7 引物对，随机选取 960 个白色克隆扩增 cDNA 插入片段，从中选取了 255 个电泳效果比较好的克隆片段作为统计样本。根据电泳图中各个克隆 cDNA 插入片段的大小，除去 T_3、T_7 和质粒片段的长度，统计结果见表 2。结果表明，cDNA 插入片段大多位于 2.0—0.5 kb 之间，极少数的 cDNA 插入片段小于 0.5 kb，平均长度 $\approx$ 1.0 kb（表 2、图 2）。

2.2.3 cDNA 片段插入 λ-ZAP 载体的重组率 加入 IPTG、X-gal、氨苄青霉素的 LB 琼脂平板，37 ℃培养过夜后放入 4 ℃冰箱 10 h。菌落数的统计结果为：1 500 个克隆中有 41 个蓝色克隆，cDNA 片段插入 λ-ZAP 载体的重组率为 97.3%。

表 1 猕猴大脑前额叶 cDNA 文库滴度测定结果

Tab. 1 The result of titer-testing in the cDNA-library of the prefrontal cortex of the rhesus monkey

平板编号 Number of plates	稀释倍数 Diluted times	稀释后滴度 Titer of diluted library（pfu/mL）	文库滴度 Titer of library（pfu/mL）
1	10	2.05×10^5	2.05×10^6
2	100	1.9×10^4	1.9×10^6
3	1 000	2.0×10^3	2.0×10^6
平均值 Average value			$\approx 2.0\times10^6$

表 2 猕猴大脑前额叶 cDNA 文库 cDNA 插入片段长度

Tab. 2 Length of inserted cDNA fragments in the cDNA-library constructed

cDNA 长度 Length of cDNA（bp）	≥1000	≥750	≥500	<500	平均长度 Average length ≈ 1 000 bp
克隆数 Number of clones	141	84	26	4	克隆总数 Total number of clones = 255
占总数的百分数 Percentage（%）	55.3	32.9	10.2	1.57	

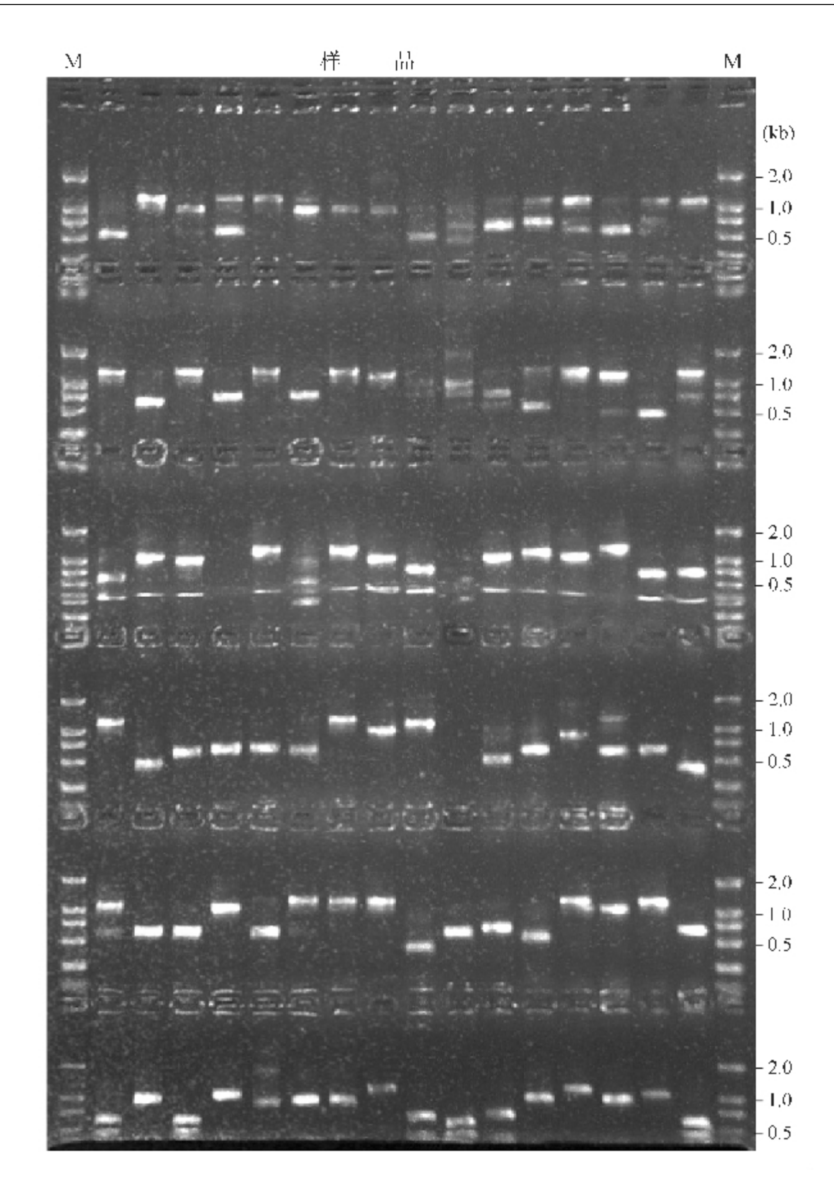


图 2　部分克隆的 cDNA 插入片段电泳图

Fig. 2　The electromorph of inserted cDNAs in some clones

M：表示分子量标记，样品为随机选取的 cDNA 插入片段，空白泳道表示克隆的 PCR 扩增反应失败。

M is the molecular weight marker and samples were randomly picked from the cDNA clones. Blank lanes indicate unsuccessful PCR of clones.

3　讨　论

本文构建的 cDNA 文库是原始经典库，cDNA 插入片段不经过 PCR 扩增。因此，各个基因表达的 mRNA 模板量没有人为增加或减少其在库中所占比例。这样，从根本上保证了每个基因在文库中表达的克隆数比例与实际情况相符。根据文库中各个基因表达的克隆数所占之比例，可以推测出该基因的实际表达量的高低；但这也会导致 cDNA 文库的的滴度不易提高，整个文库的容量不容易做大。不过，我们采用了 Stratagene 公司的 cDNA 文库构建系统，它具有高效率的 cDNA 反转录和合成机制，以及高效率的连接反应系统和高质量的 λ-ZAP 噬菌体载体系统。再加上高质量的 mRNA，完全可以弥补 cDNA 文库的不足。

文库质量的高、低主要体现在其库容、插入 cDNA 片段的大小和文库 cDNA 片段重组率三个方面。文库必须具备有足够量的克隆数，才能保证基因组 cDNA 中的每个序列至少有一个拷贝存在于重组文库中。达到此要求的条件：（1）文库容量不低

于 1.7×10^5 个克隆（Sambrook et al，2001）；（2）为了保证 cDNA 片段的完整性，插入片段的平均长度不能低于 1.0 kb（Yang et al，2004；Jin et al，2004；Tanaka et al，1996）；（3）文库重组率不能低于 90%。我们构建 cDNA 文库的滴度（pfu/mL）是 2.0×10^6 克隆/mL，总库容为 2×10^6 个克隆；绝大多数的插入片段长度不小于 0.5 kb，55.3%的片段大于 1 kb，平均长度大约 1.0 kb；文库重组率达 97.3%。文库的各项指标均达到或超过基本要求（Sambrook et al，2001）。

构建动物整个脑组织 cDNA 文库的工作已有报道(Ohara et al，1997；Kalz-Fuller et al，1995；Brookes et al，1995；Sasaki et al，1994；Kobayashi et al，1991；Walker et al，1989)，但构建非人灵长类动物大脑某一特定组织 cDNA 文库的工作比较少。尤其是仅仅针对猕猴大脑的某个区域（如 PFC 区）构建 cDNA 文库的工作，则未见报道。猕猴脑组织 PFC 区 cDNA 文库的建立，为克隆大脑 PFC 区特异表达的基因产物、测定基因编码区的序列、揭示具有多种剪切组合（alternative splicing）基因的剪切模式等都提供了可靠的资源。通过测定猕猴大脑 PFC 区特异表达基因的 cDNA 一级序列，并同人的同源序列进行比较，以分析基因编码区变异的模式及其同大脑信号传递的关系。该文库的建立，也为未来相关基因表达调控的研究提供了方便，如通过转基因在真菌和哺乳动物细胞系体系中进行基因表达调节和基因效应的研究等。

参考文献：

Brookes AJ，Slorach EM，Evans KL. 1995. Identifying genes within microdissected genomic DNA: Isolation of brain expressed genes from a translocation region associated with inherited mental illness [J]. *Mamm Genome*, **6**(4): 257-262.

Chen FC，Li WH. 2001. Genomic divergences between humans and other hominoids and the effective population size of the common ancestor of humans and chimpanzees [J]. *Am J Hum Genet*, **68**(2): 444-456.

Ebersberger I，Metzler D，Schwarz C，Pääbo S. 2002. Genomewide comparison of DNA sequences between humans and chimpanzees [J]. *Am J Hum Genet*, **70**(6): 1490-1497.

Fujiyama A，Watanabe H，Toyoda A，Taylor TD，Itoh T，Tsai SF，Park HS，Yaspo ML，Lehrach H，Chen Z，Fu G，Saitou N，Osoegawa K，de Jong PJ，Suto Y，Hattori M，Sakaki Y. 2002. Construction and analysis of a human-chimpanzee comparative clone map [J]. *Science*, **295**(5552): 131-134.

Goodman M，Porter CA，Czelusniak J，Page SL，Schneider H，Shoshani J，Gunnell G，Groves CP. 1998. Towards a phylogenetic classification of primates based on DNA evidence complemented by fossil evidence [J]. *Mol Phyl Evol*, **9**: 585-598.

Jin ZP，Zhao DX，Qiao CL，Fu CX. 2004. Construction of cDNA library from the callus of *Saussrea medusa* Maxim [J]. *Chin Bull Botany*, **21**(1): 61-65. [金治平，赵德修，乔传令，付春祥. 2004. 水母雪莲愈伤组织 cDNA 文库的构建. 植物学通报，**21**(1): 61-65.]

Kalz-Fuller B，Bieberich E，Bause E. 1995. Cloning expression of glucosidase I from human hippocampus [J]. *Eur J Biochem*, **231**(2): 344-351.

Kawamura S，Tanabe H，Watanabe Y，Kurosaki K，Saitou N，Ueda S. 1991. Evolutionary rate of immunoglobulin alpha noncoding region is greater in hominoids than in Old World monkeys [J]. *Mol Biol Evol*, **8**(6): 743-752.

Kobayashi H，Takahashi H，Oyanagi K，Ikuta F，Miyatake T，Tsuji S. 1991. Construction of spinal cord cDNA library and application for subtractive cloning of spinal cord-specific cDNAs [J]. *J Mol Neurosci*, **3**(2): 59-64.

Ohara O，Nagase T，Ishikawa K，Nakajima D，Ohira M，Seki N，Nomura N. 1997. Construction and characterization of human brain cDNA libraries suitable for analysis of cDNA clones encoding relatively large proteins [J]. *DNA Res*, **4**(1): 53-59.

Osada N，Hida M，Kusuda J，Tanuma R，Hirata M，Suto Y，Hirai M，Terao K，Sugano S，Hashimoto K. 2002. Cynomolgus monkey testicular cDNAs for discovery of novel human genes in the human genome sequence [J]. *BMC Genomics*, **3**(1): 36.

Sambrook J，Russell DW. 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3nd ed [M]. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press.

Sasaki YF，Iwasaki T，Kobayashi H，Tsuji S，Ayusawa D，Oishi M. 1994. Construction of an equalized cDNA library from human brain by semi-solid self-hybridization system [J]. *DNA Res*, **1**(2): 91-96.

Savatier P，Trabuchet G，Chebloune Y，Faure C，Verdier G，Nigon VM. 1987. Nucleotide sequence of the deltabeta-globin intergenic segment in the macaque: Structureand evolutionary rates in higher primates [J]. *J Mol Evol*, **24**: 297-308.

Shou TD. 2001. Neurobiology [M]. Beijing: Higher Education Publishing. [寿天德. 2001. 神经生物学. 北京：高等教育出版社.

Tanaka T，Ogiwara A，Uchiyama I，Takagi T，Yazaki Y，Nakamura Y. 1996. Construction of a normalized directionally cloned cDNA library from adult heart and analysis of 3040 clones by partial sequencing [J]. *Genomics*, **35**(1): 231-235.

Walker DG，Boyes BE，McGeer PL，McGeer EG. 1989. Strategies for the identification of novel brain specific genes affected in Alzheimer disease [J]. *Can J Neurol Sci*, **16**(4 Suppl): 483-489.

Wang HY，Tang H，Shen CK，Wu CI. 2003. Rapidly evolving genes in human: I. The glycophorins and their possible role in evading malaria parasites [J]. *Mol Biol Evol*, **20**: 1795-1804.

Yang F，He ZM，Zhan XQ，Chen ZC，Yan B，Huang HK，Li TQ. 2004. Construction and identification of directional cDNA library from Chinese giant salamander *Andrias avidianus* liver [J]. *Acta Zool Sin*, **50**(3): 475-478. [杨 芳，贺智敏，詹显全，陈主初，严 斌，黄宏科，李廷宝. 2004. 大鲵肝脏组织定向 cDNA 文库的构建及鉴定. 动物学报，**50**(3): 475-478.]